НАУЧНО–ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

REF **В-231** **200**

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению набора реагентов «ИФА-HBsAg-подтверждающий тест»

Тест для подтверждения специфичности выявления HBsAg иммуноферментным анализом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОДЕРЖАНИЕ

I. НАЗНАЧЕНИЕ 3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА 3
III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-HBsAg-подтверждающий тест» 3
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 3
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 3
VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ 4
VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ 4
VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ 4
IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ 5
X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 5
XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ 5
XII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ 6
XIII. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА 6
XIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ 6

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор реагентов рассчитан на проведение 200 определений, включая контрольные.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "ИФА-HBsAg-подтверждающий тест" предназначен для подтверждения специфичности результатов выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) методом ИФА.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Подтверждение наличия поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) в исследуемых образцах основано на реакции нейтрализации. Исследуемые образцы вносятся в две лунки планшета, в одну из которых добавляется контрольный реагент (АНТИ-HBs-МИНУС), а во вторую – нейтрализующий реагент (АНТИ-HBs-ПЛЮС). Нейтрализующий реагент содержит поликлональные антитела к HBsAg, которые связывают HBsAg и делают невозможным образование комплекса HBsAg с антителами в составе иммуносорбента и конъюгата.

В результате реакции нейтрализации происходит уменьшение степени окраски (подавление сигнала) в лунке с АНТИ-HBs-ПЛЮС на заключительной стадии ИФА. При этом в лунке с АНТИ-HBs-МИНУС нейтрализация отсутствует, и образование комплекса HBsAg –антитела проходит нормально.

III. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-HBsAg-подтверждающий тест»

Таблица 1

Характеристики реагентов		Форма выпуска
АНТИ-HBs-ПЛЮС	Нейтрализующий реагент, инактивированный. Прозрачная розового цвета жидкость.	1 флакон 5,0 мл
АНТИ-HBs-МИНУС	Контрольный реагент, инактивированный. Прозрачная голубого цвета жидкость.	1 флакон 5,0 мл

Объемы реагентов указаны на этикетках флаконов.

Набор комплектуется готовыми реагентами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая чувствительность

Все реактивные образцы сывороток крови (n=453) пациентов с острым и хроническим гепатитом В, были подтверждены с помощью реакции нейтрализации в «ИФА-HBsAg-подтверждающем тесте».

Эквивалентность результатов подтверждения образцов сыворотки и плазмы

Дополнительными исследованиями коллекции подтвержденных положительных парных образцов сыворотки и плазмы (n=25) была показана эквивалентность их подтверждения.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

5.2. Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике.

5.3. Правила лабораторной практики и меры предосторожности, которые необходимо соблюдать при работе с набором представлены в таблице 2.

Таблица 2

<table>
<tr><td> </td><td colspan="3">• ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой, не превышающей установленные нормы в соответствии с существующими нормативными документами.
• Не изменять процедуру проведения анализа.
• Не использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
• Не проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли.
• Тщательно промывать лабораторную посуду.
• Рабочие растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
• Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной (деионизированной).
Многоразовые ванночки для автоматических анализаторов сразу после работы ополоснуть водой дистиллированной. Затем промыть 70% раствором этилового спирта и снова ополоснуть водой дистиллированной.
• Соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполнены, не допускать остатка жидкости в лунках после промывки.
• Использовать валидированные дозаторы и оборудование, новые наконечники для каждого образца.
• Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света во время инкубации и хранения.</td></tr>
<tr><td> </td><td>• Не пипетировать ртом.
• Промывать руки после работы с набором реагентов и исследуемыми образцами.</td><td> </td><td>• При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами использовать спецодежду и одноразовые перчатки.</td></tr>
<tr><td> </td><td>• В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.</td><td rowspan="2"> </td><td rowspan="2">• Сыворотки (плазмы) крови человека, используемые при приготовлении АНТИ-HBs-ПЛЮС и АНТИ-HBs-МИНУС не содержат HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1 и антител к HBsAg, ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С.
• При работе с реагентами набора (АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС), исследуемыми образцами и оборудованием нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.</td></tr>
<tr><td> </td><td>• Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность раствором хлорсодержащего дез. средства, согласно инструкции по применению.
• Отходы, содержащие биологические образцы, нужно нейтрализовать до сброса в канализацию. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.</td></tr>
</table>

VI. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ 287-113).

VII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Вода дистиллированная или деионизированная;
- ИФА-тест-система для выявления HBsAg;
- Дозаторы пипеточные переменного объема для отбора жидкостей;
- Наконечники одноразовые для дозаторов пипеточных;
- Инкубатор микропланшетный (термостат) или термостатируемый шейкер;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Микропланшетный ридер (анализатор иммунологический) (фильтры 450 нм и 620-680 нм);
- Бумага фильтровальная лабораторная;

VIII. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов крови проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать образцы сыворотки\плазмы или препараты крови с положительным результатом выявления HBsAg в коммерческих ИФА-тест-системах. Образцы, содержащие агрегаты или осадок, осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин (15 мин, 2-8 °С).

Образцы можно хранить в соответствии с требованиями существующих нормативных документов. Длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (замораживание\оттаивание не более 1 раза). Во избежание осаждения фибрина плазму размораживать в течение нескольких минут при температуре (39,0 ± 1,0) ºС на водяной бане. Нельзя использовать сыворотку\плазму загрязненную, с гемолизом или гиперлипидемией.

IX. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:
АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС

X. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед использованием набор выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре.

Этап	Процедура постановки
1	Перед началом работы определить необходимое количество стрипов иммуносорбента используемой тест-системы. При этом нужно учесть: -количество лунок с К+ и К-, необходимое для оценки валидности результатов постановки используемой тест-системы (определить согласно инструкции по применению используемой тест-системы); -количество лунок с К+ и К-, необходимых для оценки валидности результатов подтверждающего теста (по 2 лунки для каждого контрольного образца); -количество лунок для подтверждения исследуемых образцов (для одного образца необходимы 2 лунки).
2	Подготовить компоненты используемой тест-системы в соответствии с инструкцией по применению.
3	В рассчитанное согласно п.1 количество лунок иммуносорбента используемой тест-системы внести образцы К+ и К- в объеме, предусмотренном инструкцией по применению тест-системы.
4	В оставшиеся лунки иммуносорбента внести подлежащие подтверждению исследуемые образцы в дублях (каждый образец внести в 2 лунки) в объеме, предусмотренном инструкцией по применению тест-системы.
5	В лунки с исследуемыми образцами и контрольными образцами, предназначенными для оценки валидности подтверждающего теста, внести по 25 мкл реагентов подтверждающего теста (в первую лунку 25 мкл АНТИ-HBs-МИНУС, во вторую лунку 25 мкл АНТИ-HBs-ПЛЮС). Внимание: в лунки с К+ и К-, предназначенными для оценки валидности результатов постановки используемой тест-системы, реагенты подтверждающего теста вносить не нужно.
6	Последующие этапы ИФА выполнять в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы.

XI. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Результаты ИФА учитывать, если значения оптической плотности (ОП) в лунках с контрольными образцами без добавления АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС соответствуют требованиям, изложенным в инструкции по применению используемой тест-системы.

ОП крит. рассчитывать по формуле, приведенной в инструкции по применению используемой тест-системы.

Результаты подтверждающего теста валидны, если:

-значения ОП в лунках с К- после внесения АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС ниже ОП крит.;

-значения ОП в лунках с К+ после внесения АНТИ-HBs-ПЛЮС минимум в 2 раза ниже по сравнению с ОП К+ после внесения АНТИ-HBs-МИНУС.

Присутствие HBsAg в исследуемых образцах определяется показателем нейтрализации - это соотношение значений оптической плотности образца в лунках АНТИ-HBs-МИНУС и АНТИ-HBs-ПЛЮС. Показатель нейтрализации (%) определяется по формуле:

$$\frac{\textbf{(ОПк – ОПн)}}{\textbf{(ОПк – ОП К-}_{\textbf{ср}}\textbf{)}} \textbf{ x 100\%,}$$

ОПк - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-МИНУС;
ОПн - оптическая плотность образца после внесения АНТИ-HBs-ПЛЮС;
ОП К-$_{ср}$ - среднее значение оптической плотности контрольного отрицательного образца.
Образец считается содержащим HBsAg, если показатель нейтрализации 50% и более.
Образец считается не содержащим HBsAg, если показатель нейтрализации менее 50 %.

В ряде случаев в образцах с ОП ≥ 1,0 показатель нейтрализации может быть менее 50% из-за высокого содержания HBsAg. В этом случае образец следует развести рабочим промывочным раствором и повторить тестирование (рекомендуется развести в 25, 250 раз и более при необходимости). Образец считается содержащим HBsAg, если хотя бы для одного из выбранных разведений соблюдаются условия:

-ОП в лунке с АНТИ-HBs-МИНУС более ОП крит.;

-показатель нейтрализации 50 % и более.

XII. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

12.1	**Условия и сроки хранения набора реагентов «ИФА-HBsAg-подтверждающий тест»**		
	Хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.		**Срок годности 24 месяца.** Срок годности серии указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит
12.2	**Условия и сроки транспортирования набора реагентов «ИФА-HBsAg-подтверждающий тест»**		
	при температуре от 2 до 8 °С.		
	при температуре до 25 °С.		10 сут
	при температуре до 30 °С.		5 сут
12.4.	**Условия и сроки хранения неиспользованных реагентов набора после вскрытия (***в упаковке производителя, флаконы плотно закрыть винтовыми крышками и хранить в сухом, защищенном от света месте)*		
	АНТИ-HBs-ПЛЮС, АНТИ-HBs-МИНУС	при температуре от 2 до 8 ºС.	в течение срока годности тест-системы

XIII. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

- Производитель гарантирует соответствие выпускаемого продукта требованиям нормативной и технической документации.
  Безопасность и качество продукта гарантируются в течение всего срока годности.
- Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 467-82-15, 467-82-18 (доб. 7647, 7655) или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: help-ds@npods.ru, info@npods.ru, www.npods.ru.

Для проведения расследования и получения объективных выводов по заявленной рекламации необходимо предоставление:

1.рекламационного набора,
2.всех образцов кроводач пациента,
3.протоколов исследований с использованием других методов с указанием серии, сроков годности,
4.протоколов исследований с использованием референтных тестов с указанием серии, сроков годности.

XIV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

IVD	Для диагностики *in vitro*	+2°C +8°C	Температурные пределы хранения
	Производитель	EXP.	Срок годности число/месяц/год
REF	Каталожный номер		Дата изготовления месяц/год
Σ	Количество определений		Использовать инструкцию по применению
LOT	Номер партии (серии)	Code: X.X.XX	Идентификационный код

Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

- «Внимание», символ 5.4.4;
- Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.4;
- Беречь от влаги, символ 5.3.2.